

Программа «Структурная биология»

Курс « Оптическая спектроскопия»

Алексей Валерьевич Феофанов

**Кафедра биоинженерии
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова**

**Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН**

Лекция 1

Цель изучения дисциплины: получение базовых знаний о методах оптической спектроскопии, о возможностях и способах их применения к решению задач структурной биологии

Методы оптической спектроскопии:

- Молекулярная спектроскопия электронного поглощения света
- Молекулярная флуоресцентная спектроскопия
- Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением
- Поляризационная флуоресцентная спектроскопия
- Флуоресцентная спектроскопия на основе Фёрстеровского резонансного переноса энергии
- Флуоресцентная спектроскопия одиночных молекул
- Спектроскопия кругового дихроизма
- Инфракрасная (ИК) спектроскопия молекул
- Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света и ее разновидности

Лекция 1.

1.1 Свет и его характеристики.

1.2 Взаимодействие света с молекулами.

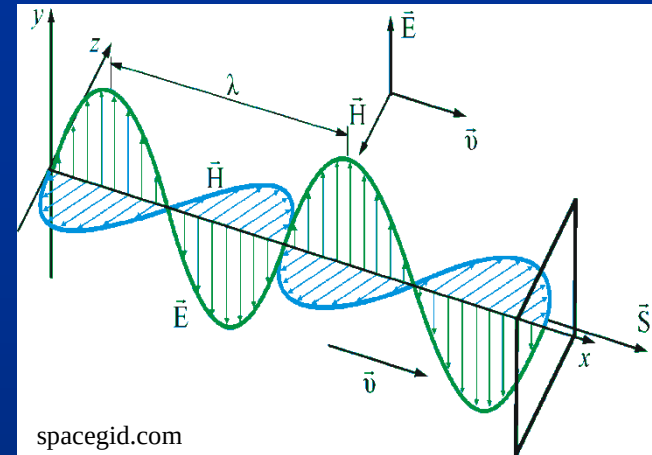
1.3 Молекулярная спектроскопия электронного поглощения света.

Свет (видимый свет) — электромагнитное излучение, воспринимаемое человеческим глазом.

Параметры света (электромагнитных колебаний):
длина волны λ , частота колебаний ν ,
период колебаний T

$$\nu = c / \lambda = 1/T \text{ (с}^{-1}\text{)}$$

где c — скорость света ($299\,792\,458 \text{ м/с} \approx 3 \times 10^8 \text{ м/с}$)
единица измерения частоты колебаний - $1 \text{ с}^{-1} = 1 \text{ Гц}$



Свет (в широком понимании) - оптическое (электромагнитное) излучение с длинами волн $\sim 10 \text{ нм} - \sim 0,1 \text{ мм}$. Включает в себя ультрафиолетовый (УФ), видимый и инфракрасный (ИК) свет.

**Видимый свет: $\lambda = 380\text{-}780 \text{ нм}$,
 $750\text{-} 395 \text{ ТГц}$ (10^{12} Гц);**

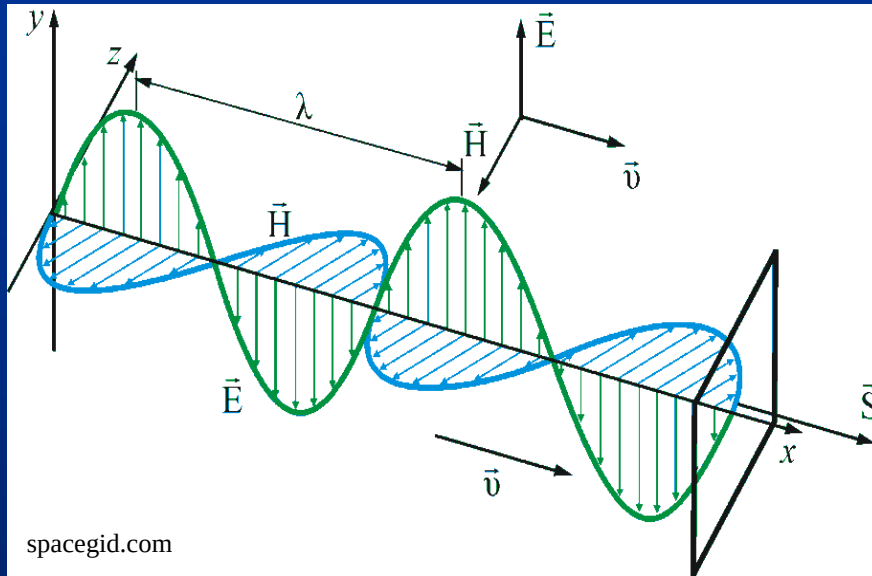
УФ диапазон: $\lambda = 10 - 380 \text{ нм}$;

ИК диапазон: $\lambda = 780 \text{ нм} - 0,1 \text{ мм}$



Свет — это электромагнитная волна или поток частиц — фотонов

Волна — длина волны, период колебаний, частота колебаний, поляризация



$$E = E_0 \cos(\omega t - kx + \varphi)$$

интенсивность света:

$$I \sim E^2$$

Фотон (частица) - энергия, импульс, собственный момент импульса, нулевая масса

$$E_\phi = h\nu = pc = hc/\lambda,$$

где h — постоянная Планка $h = 6,6 \times 10^{-34}$ Дж.с, p — импульс фотона.

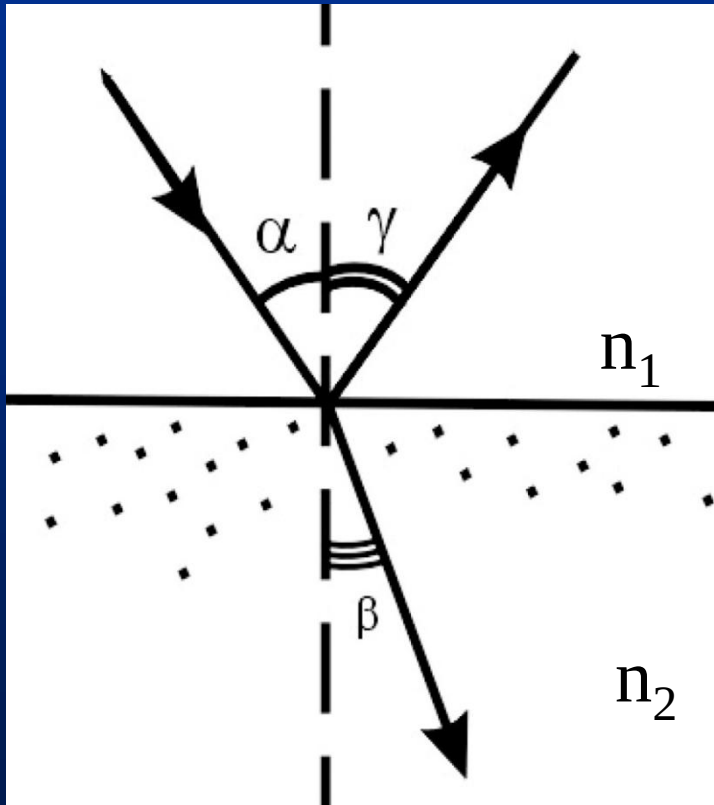
Корпускулярно-волновой дуализм (Луи де Бройль):

волновые свойства объясняют способность света к дифракции и интерференции,

корпускулярные свойства объясняют поглощение света и его излучение.

Отражение и преломление света

Скорость света в среде: $v=c/n$,
 n – показатель преломления среды



$$\alpha = \gamma$$

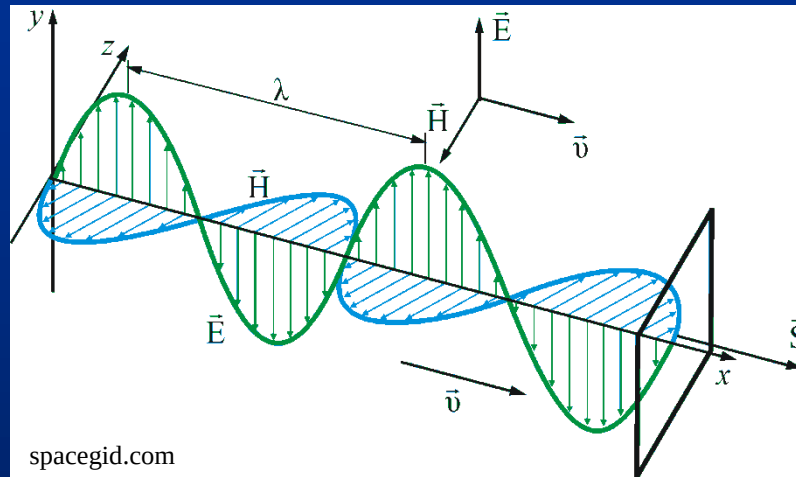
закон Снелиуса:
 $\sin \alpha / \sin \beta = n_2 / n_1$

При движении волны в средах с разными показателями преломления её частота сохраняется, а длина волны изменяется пропорционально скорости.

$$\lambda = v / \nu \quad v = c / (n \nu)$$

Поляризация световой волны (поляризация света)

Для световых (электромагнитных) волн поляризация — это направленное колебание вектора напряжённости электрического поля $\vec{E}$ (или напряжённости магнитного поля $\vec{H}$)



Если конец вектора $\vec{E}$ описывает в плоскости перпендикулярной направлению распространения света эллипс - это эллиптическая поляризация.

Эллиптическая поляризация в зависимости от направления вращения вектора $\vec{E}$ бывает положительной (правой) и отрицательной (левой).

Частные случаи эллиптической поляризации: линейная (*плоско-поляризованная волна*) и круговая (циркулярная) поляризации

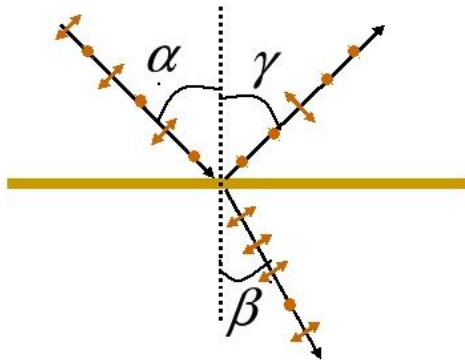
Волны света имеют разную поляризацию — свет не поляризован

Причины возникновения поляризации света:

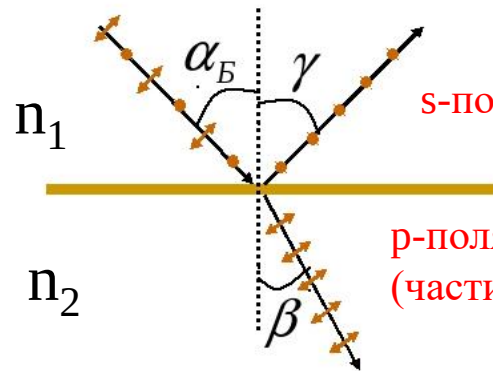
- особенности генерации электромагнитных волн в источнике света;
- анизотропность среды распространения световых волн;
- преломление и отражение на границе двух сред (угол Брюстера).

■ При отражении и преломлении свет поляризуется.

■ Частичная поляризация



■ Полная поляризация



s-поляризованная волна

p-поляризованная волна
(частично)

$$\alpha = \alpha_B$$

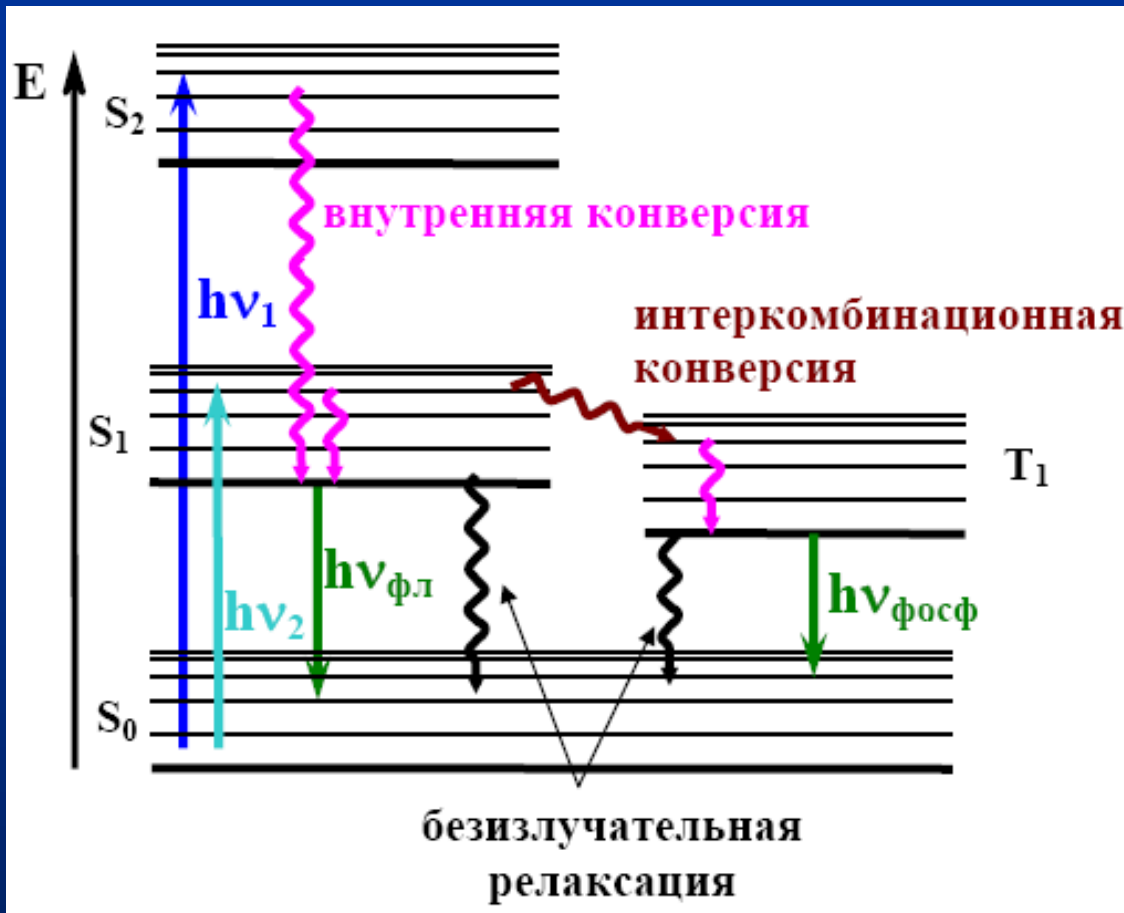
$$\operatorname{tg} \alpha_B = n_2 / n_1$$

$$\alpha + \beta = 90^\circ$$

- **угол Брюстера** (угол падения, при котором происходит полная поляризация).

Взаимодействия света с электронными уровнями молекул

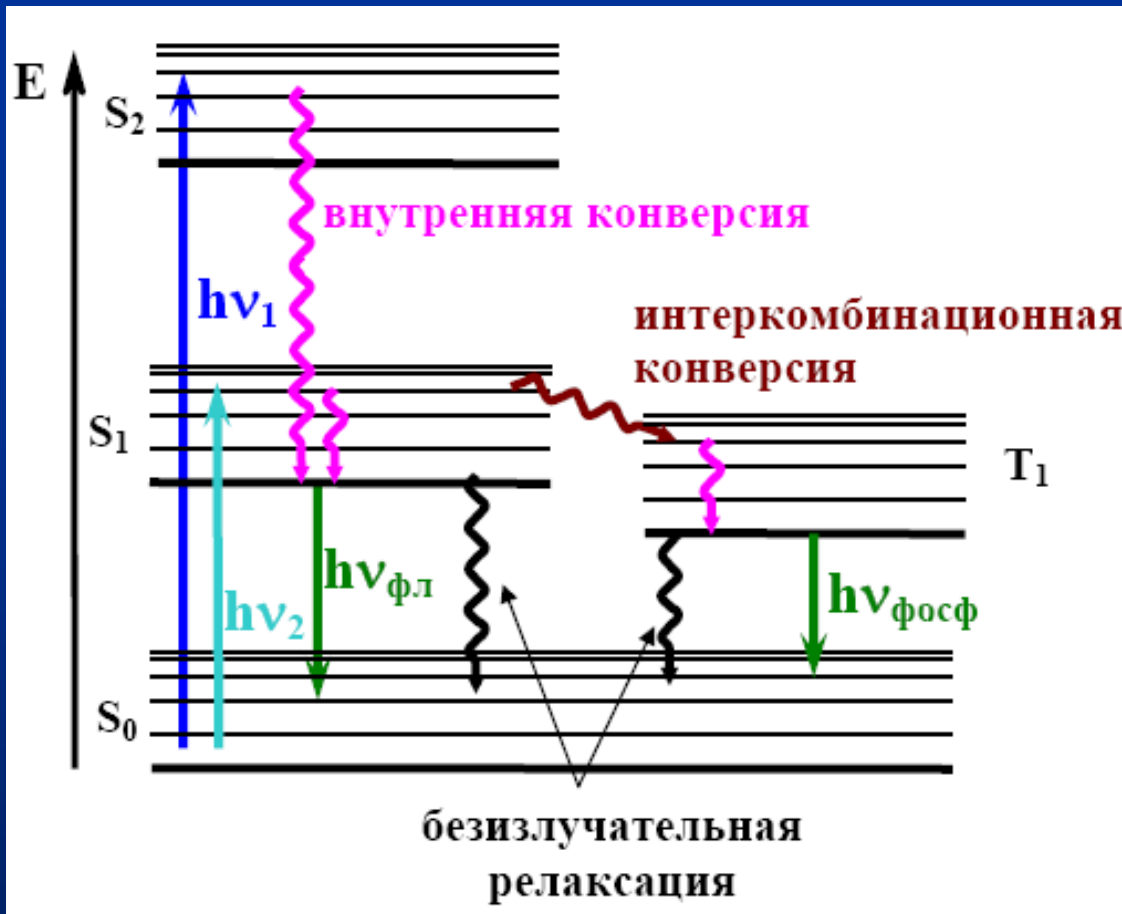
Первый постулат Бора:
электроны движутся только по определенным (стационарным) орбитам.



Второй постулат Бора (правило частот): излучение и поглощение энергии в виде кванта света происходит лишь при переходе электрона из одного стационарного состояния в другое.

Величина светового кванта равна разности энергий тех стационарных состояний, между которыми совершается переход электрона: $h\nu = E_{S1} - E_{S0}$.

Взаимодействия света с электронными уровнями молекул



Характерные времена

Поглощение кванта света -

10^{-15} с

Внутренняя конверсия и колебательная релаксация -

$10^{-14} - 10^{-11}$ с

Испускание света:

Флуоресценция -

$10^{-9} - 10^{-7}$ с

Фосфоресценция -

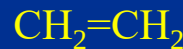
$10^{-3} - 10^2$ с

Поглощение квантов света вызывают переходы электронов



с молекулярных орбиталей основного состояния на орбитали возбужденного электронного состояния.

Где ожидается поглощение?



Переходы $\sigma \rightarrow \sigma^*$ происходят в одинарных связях при $\lambda < 160$ нм;

Переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ происходят в кратных связях при $\lambda = 160\text{-}200$ нм;

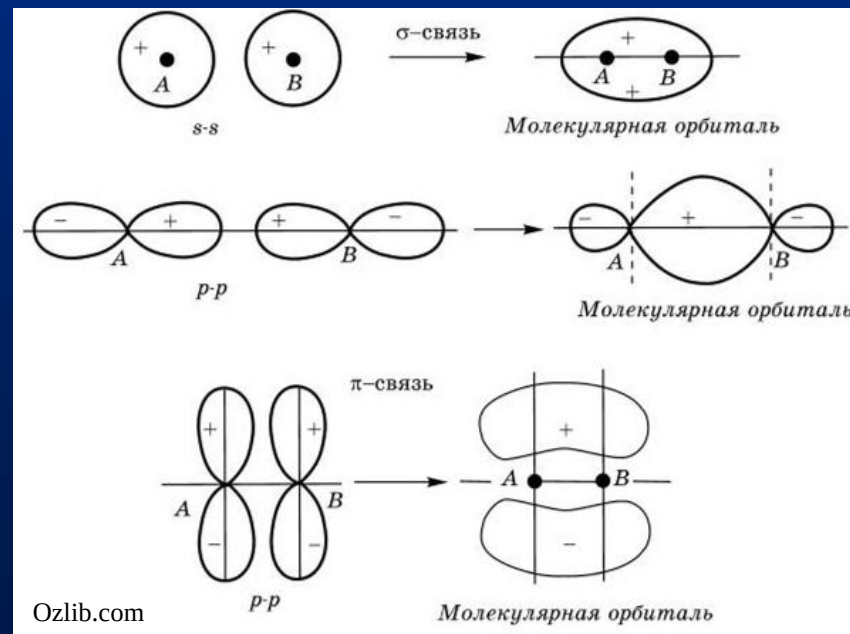
Переходы $n \rightarrow \sigma^*$ происходят (возможны) в присутствии

гетероатомов (O, N, S, P, Cl, I, Br) при $\lambda = 160\text{-}250$ нм;

Переходы $n \rightarrow \pi^*$ происходят (возможны) в присутствии

гетероатомов при $\lambda = 210\text{-}300$ нм;

Т.к. n -электроны (локализованные электроны) не образуют связей, не существует орбиталей n^* -типа

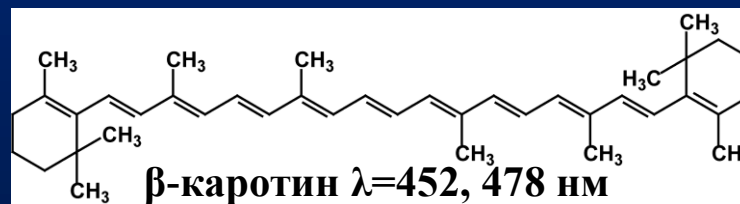
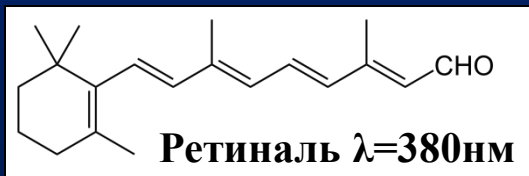


Хромофор – это любая молекулярная группа, поглощающая свет
Различные соединения с одинаковым хромофором имеют сходные характеристики поглощения света.

Ауксохромы - группы атомов (радикалы), усиливающие окраску (поглощение света) соединения при замещении ими атомов водорода этого соединения. Эта способность сильнее всего выражена у гидроксильных, SH- и амидных (первичных, вторичных, третичных) групп. Как правило, они вызывают длинноволновый («красный») сдвиг поглощения и увеличивают его интенсивность.

Если хромофорные группы разделены в молекуле двумя и более одинарными связями, их спектры поглощения света аддитивны. Это изолированные хромофоры.

Объединение хромофоров в сопряженную систему вызывает длинноволновый («красный», батохромный) сдвиг поглощения за счет делокализации π -электронов, увеличивает вероятность $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов и интенсивность поглощения.



Законы Бугера — Ламберта и Бера

Закон Бугера — Ламберта: каждый слой однородной среды поглощает определенную долю проходящего через него света (потока излучения) независимо от его интенсивности

$$\lg (I_0/I)=kl ,$$

где I_0 , I – интенсивности падающего и прошедшего света, k - коэффициент поглощения, l – толщина слоя среды в см.

$$I= I_0 \times 10^{-kl}, \quad T=I/I_0 \times 100\% = 10^{-kl} \times 100\%,$$

где T – пропускание света средой.

Закон Бера: каждая молекула растворенного вещества поглощает одно и то же количество падающего на нее света, независимо от концентрации вещества.

$$k=\varepsilon c,$$

где c – концентрация вещества, моль/л= M , ε – молярный коэффициент экстинкции или молярная экстинкция ($M^{-1} \text{ см}^{-1}$)

Закон Бугера — Ламберта — Бера

Закон Бугера — Ламберта — Бера определяет ослабление монохроматического света при прохождении через поглощающую свет среду

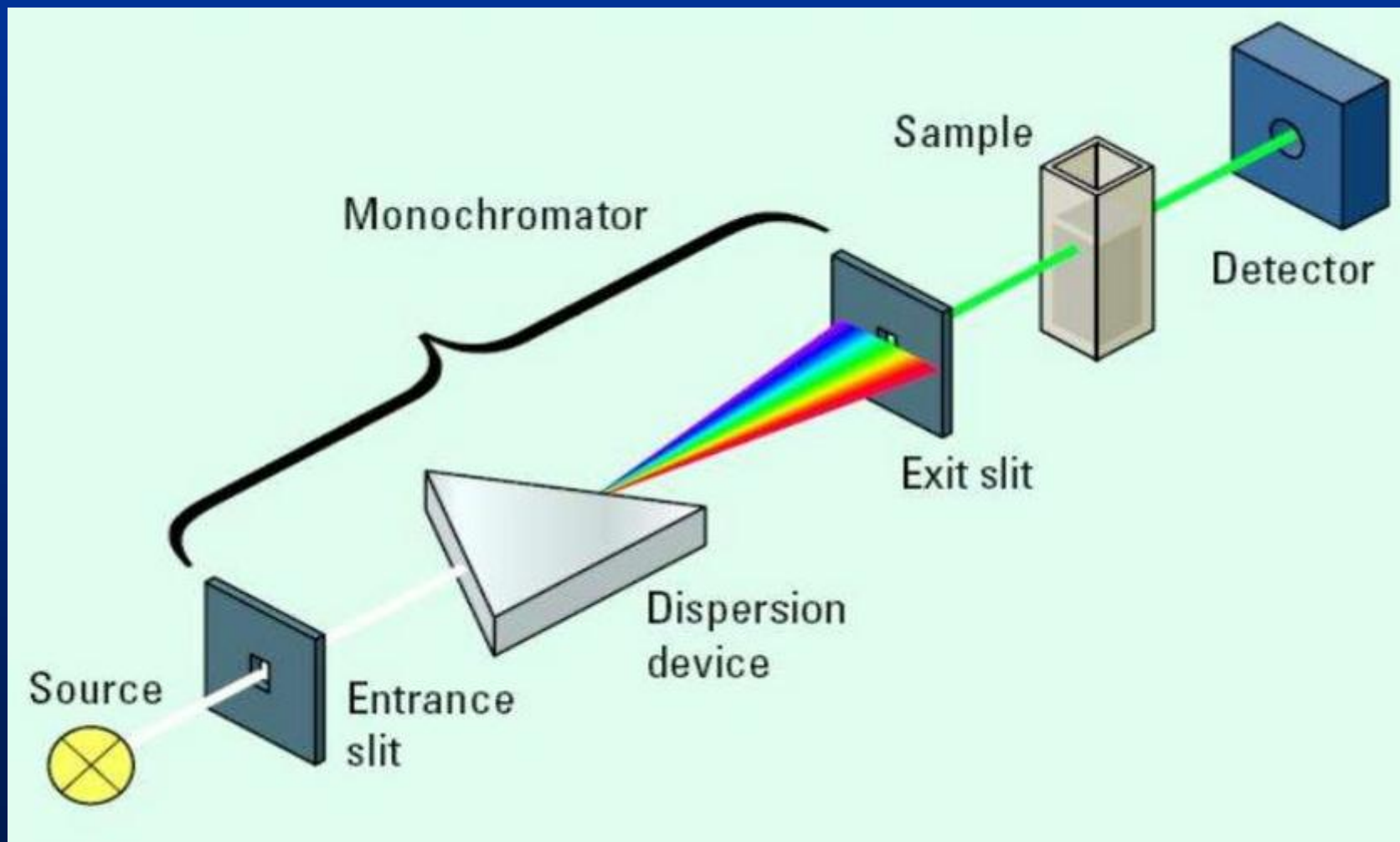
$$D = \varepsilon cl,$$

где D – оптическая плотность среды (раствора), ε – молярный коэффициент экстинкции или молярная экстинкция ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

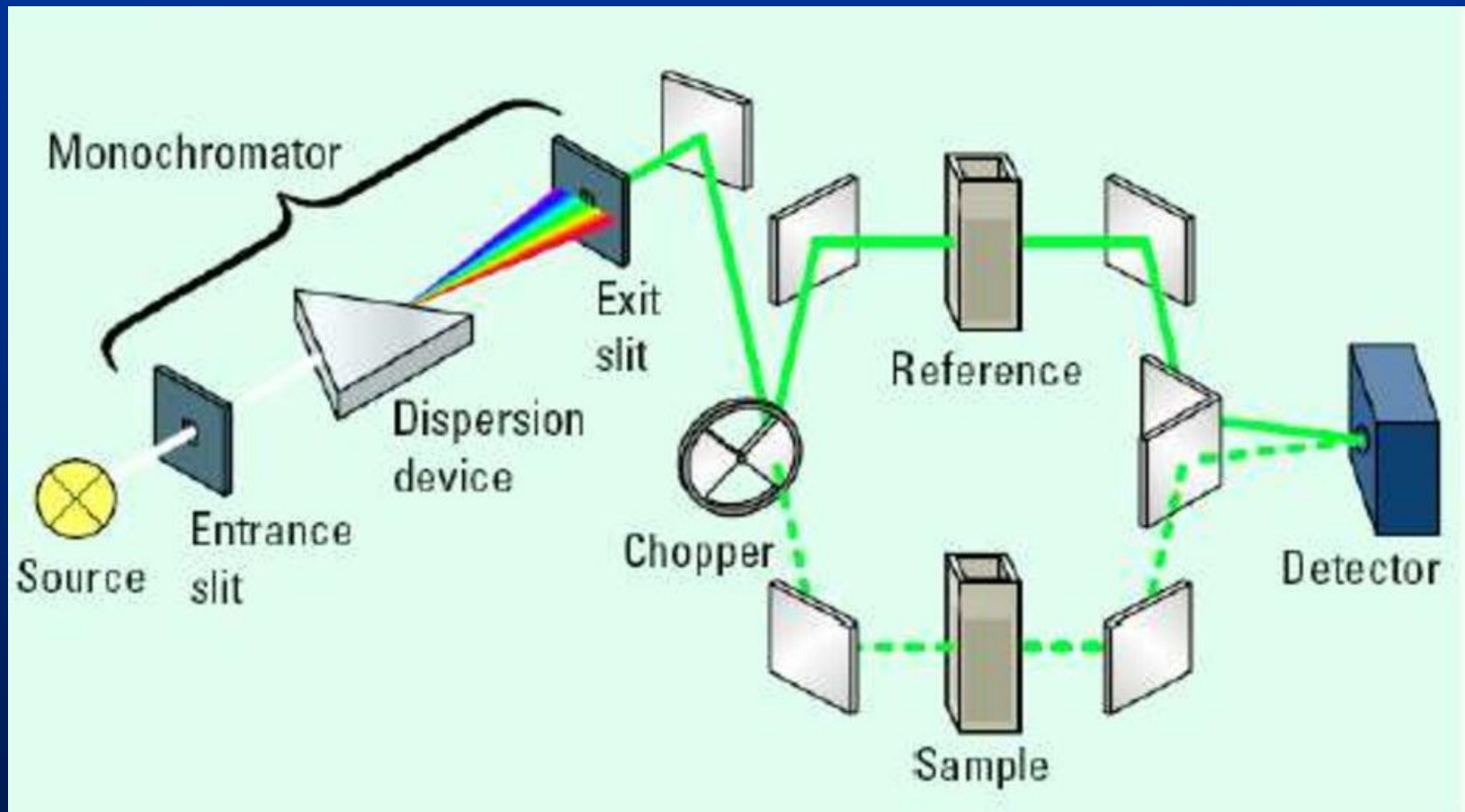
$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon cl} = I_0 \times 10^{-D}$$

Этот закон предполагает, что на способность молекулы поглощать свет не влияют другие окружающие её молекулы этого же вещества в растворе.

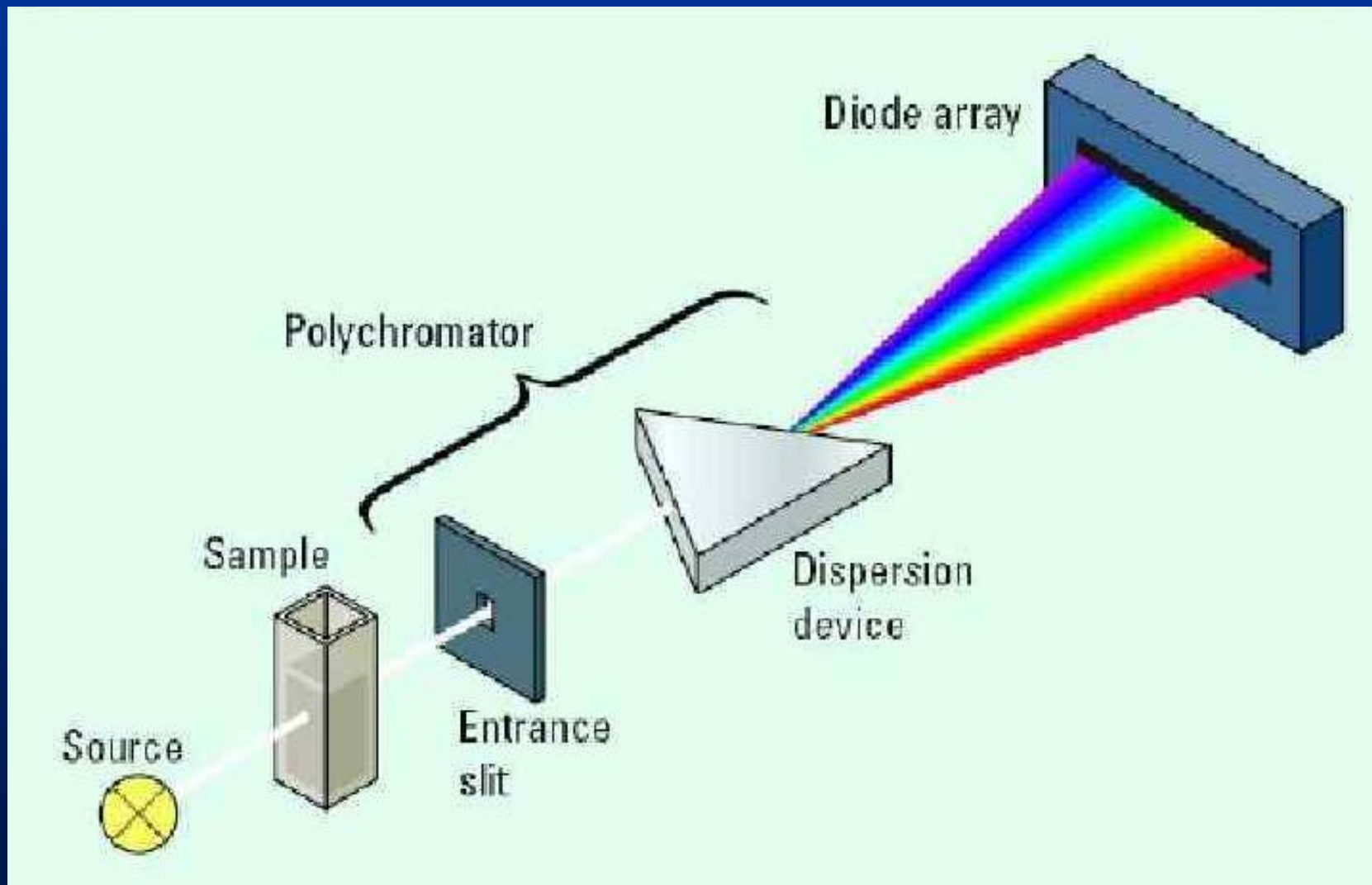
Оптическая схема однолучевого спектрофотометра



Оптическая схема двухлучевого спектрофотометра



Оптическая схема однолучевого многоканального спектрофотометра



Основные хромофоры белков:

- пептидные группы,
- боковые группы аминокислотных остатков,
- простетические группы.

Пептидные (амидные) группы белков (полипептидов) имеют широкую полосу поглощения с максимумом около 192 нм.

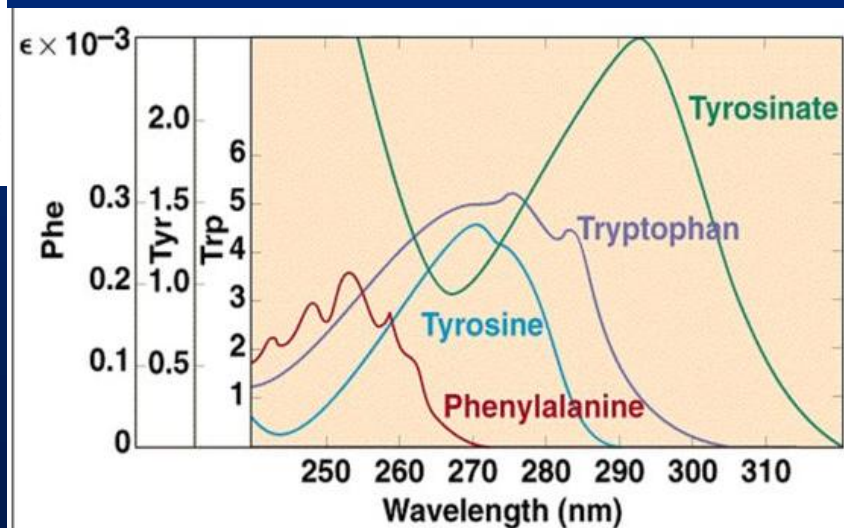
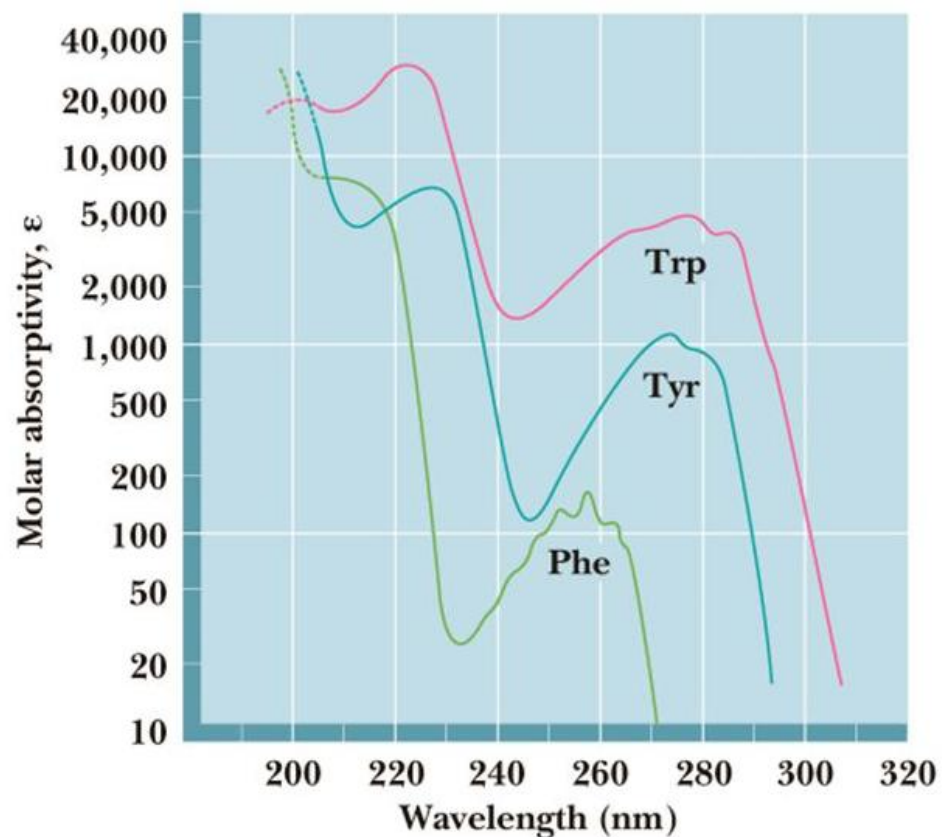
Поглощение боковых групп ряда аминокислот например, Asp, Glu, Asn, Gln, Arg и His маскируются интенсивным поглощением пептидных группы. Зарегистрировать электронные переходы этих аминокислот в белках не удастся.

Спектры поглощения белков в ближней ультрафиолетовой области спектра (240-300 нм) обусловлены поглощением аминокислот фенилаланина, тирозина и триптофана.

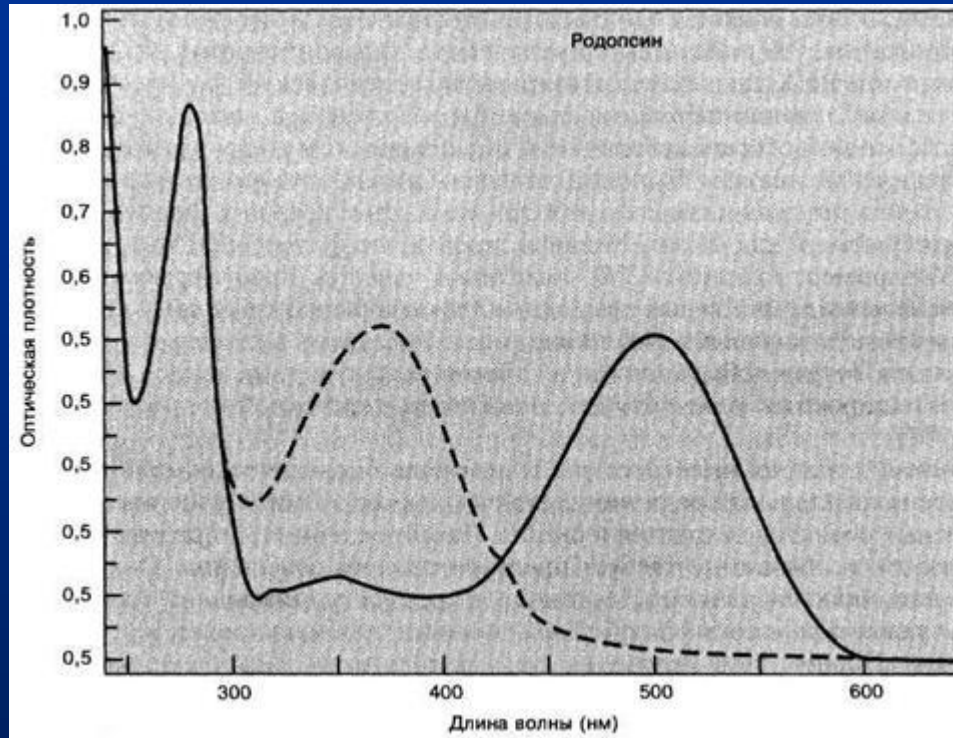
Считают, что максимум поглощения белков соответствует 280 нм

Использование воды в качестве растворителя ограничивает спектральные измерения областью длин волн > 170 нм

Спектры поглощения ароматических аминокислот



Спектры поглощения белков, содержащих простетические (хромофорные) группы



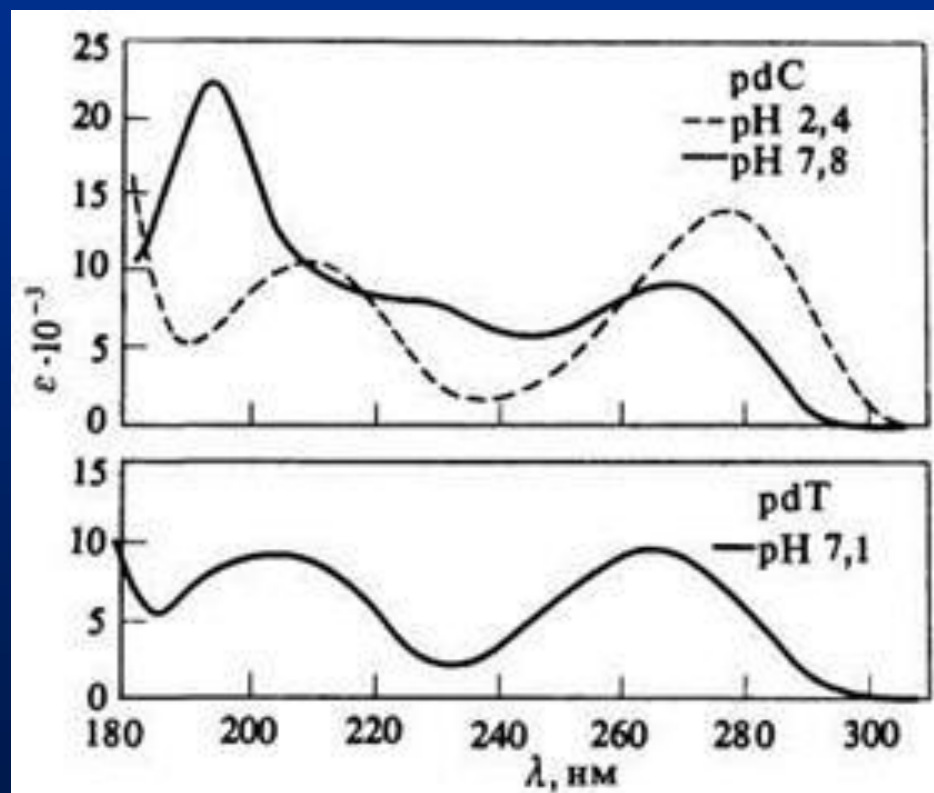
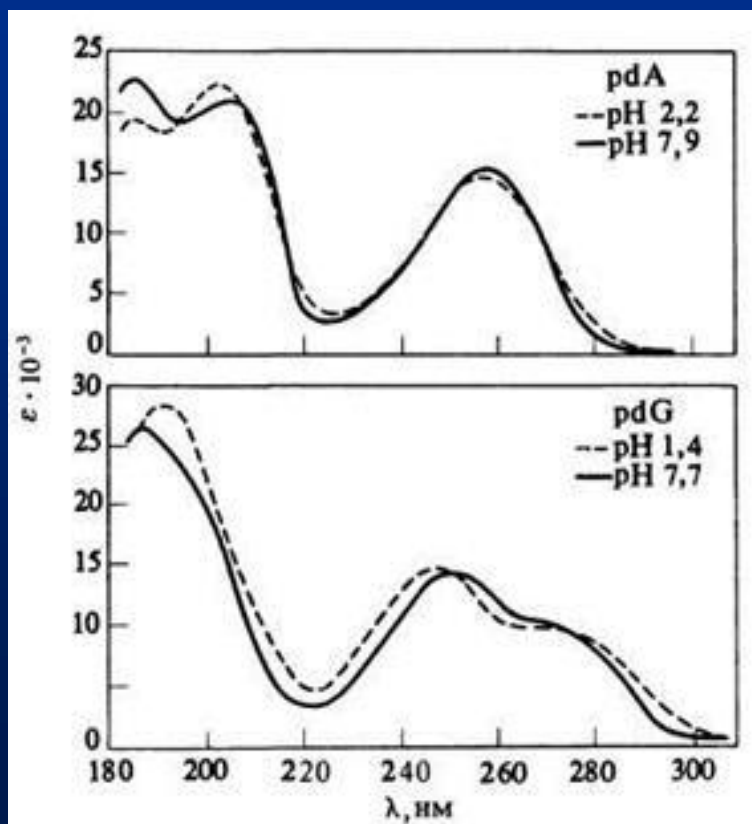
Спектр поглощения родопсина: адаптированного к темноте (сплошная линия) и после освещения светом (пунктирная линия).

Applebury et al., Biochemistry (1974) 13 : 3448.

Спектры поглощения нуклеиновых кислот

Поглощение нуклеиновых кислот в ближней УФ-области связано с поглощением пуриновых и пиримидиновых оснований.

Сахарофосфатный остов РНК и ДНК не дает вклада в поглощение при длинах волн > 200 нм.



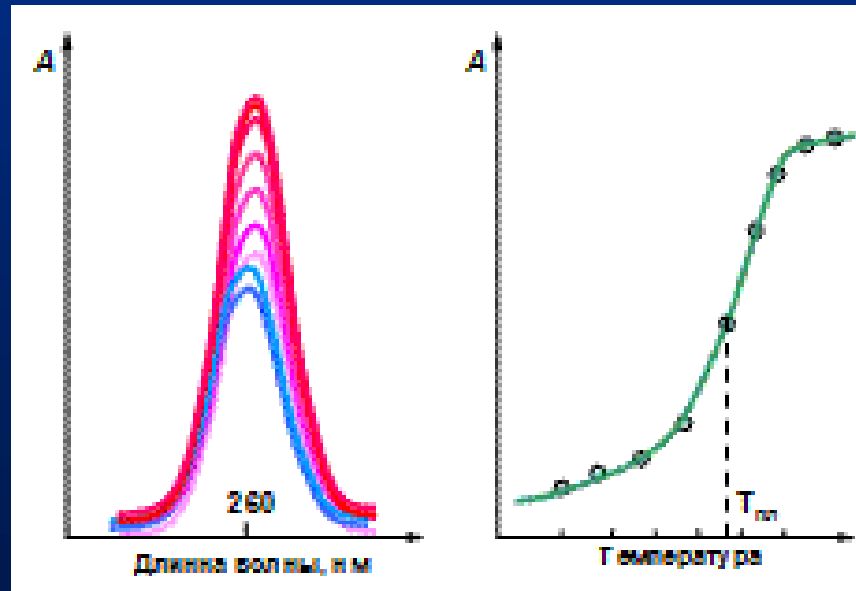
Свободное основание, нуклеозид (рибо или дезоксирибо), нуклеотид и денатурированный полинуклеотид имеют похожие спектры поглощения в области 200-300 нм.

	$\lambda_{\text{макс}}, \text{ нм}$	$\epsilon \times 10^{-3}, \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$
Рибонуклеотиды		
Аденозин-5'-фосфат	259	15,4
Цитидин-5'-фосфат	271	9,1
Гуанозин-5'-фосфат	252	13,7
Уридин-5'-фосфат	262	10,0
Дезоксирибонуклеотиды		
Дезоксиаденозин-5'-фосфат	258	15,3
Дезоксицитидин-5'-фосфат	271	9,3
Дезоксигуанозин-5'-фосфат	252	13,7
Тимидин-5'-фосфат	267	10,2

Средний коэффициент молярной экстинкции при 260 нм в расчете на моль нуклеозидов $\sim 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Гипохромизм: полинуклеотиды и нуклеиновые кислоты поглощают меньше в расчете на нуклеотид, чем сумма составляющих их нуклеотидов.

Гипохромизм нуклеиновых кислот возникает из-за взаимодействий между соседними основаниями при их упорядоченном расположении в спиральной цепи полимера. В основе эффекта - взаимодействия между переходными дипольными моментами соседних оснований



Определение температуры плавления вторичной структуры ДНК методом абсорбционной спектроскопии

Применения молекулярной спектроскопии электронного поглощения света (абсорбционной спектроскопии)

- Качественный и количественный анализ органических соединений

Качественный анализ:

- отнесение поглощения и интенсивности полос к определенным хромофорным системам;
- подтверждение идентичности соединения;
- анализ на присутствие посторонних хромофоров;
- анализ состояния хромофоров (сохранности структуры) в составе соединения.

Количественный анализ:

- определение концентрации соединения по известной экстинкции;
- определение молярной экстинкции новых соединений
- определение концентраций индивидуальных хромофоров, входящих в состав смеси. Эффективен для смесей из двух-трех хромофоров.
- изучение кинетики протекающих реакций,
- определение констант диссоциации комплексов.

Определение концентраций хромофоров в составе смеси

Случай двух хромофоров

$$D = (\varepsilon_A c_A + \varepsilon_B c_B) l$$

$$D(\lambda_1) = (\varepsilon_A(\lambda_1) c_A + \varepsilon_B(\lambda_1) c_B) l$$

$$D(\lambda_2) = (\varepsilon_A(\lambda_2) c_A + \varepsilon_B(\lambda_2) c_B) l$$

Выбор длин волн для повышения точности анализа:

на одной длине волны интенсивности поглощения компонентами А и

В сильно различаются;

на другой длине волны интенсивности поглощения компонентами А

и В сравнимы

Анализ смесей из 4 и более хромофоров –

большие погрешности метода

Количественный учет светорассеяния в спектрах поглощения

Считаем поглощение и рассеяние света независимыми процессами. Тогда измеряемая оптическая плотность D равна

$$D = D_s + D_a \quad (1),$$

где D_s и D_a - оптические плотности, обусловленные светорассеянием и истинным поглощением.

Известно, что для суспензии частиц светорассеяние равно

$$D_s = a/\lambda^n \quad (2),$$

где a и n – константы (n меняется от 0 до 4 в зависимости от формы и размеров частиц)

Прологарифмировав уравнение (2), получим

$$\lg D_s = \lg a - n \lg \lambda \quad (3).$$

где $\lg D_s$ – линейная функция $\lg \lambda$.

Построив график зависимости $\lg D = f(\lg \lambda)$, можно убедиться, что в длинноволновой области спектра, где поглощение отсутствует и $D = D_s$, получится прямая линия; экстраполировав ее, можно найти величину $\lg D_s$, а следовательно, D_s во всем измеренном спектральном интервале.

Рассчитываем $D_a = D - D_s$ и строим истинный спектр поглощения $D_a = f(\lambda)$.